

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM

Biológia Doktori Iskola

Mikroorganizmusok életfolyamatainak molekuláris analízise

Élesztő fajok stresszfolyamatainak vizsgálata

PhD értekezés tézisei

Horváth Eszter

Témavezető:

Prof. Pesti Miklós

egyetemi tanár

PÉCS, 2011

Bevezetés

Minden sejttípus, a többsejtű élőlények sejtjeit is beleértve képes a környezeti tényezők változására válaszolni. Az organizmusok reakcióját minden olyan ingerre, amely kibillenti őket homeosztázisukból és alkalmazkodásra, adaptációra kényszeríti őket, stressznek nevezzük. A szabadban élő egysejtű élőlények, mint például az élesztők sokkal inkább ki vannak szolgáltatva a környezet hirtelen változásainak, mint a többsejtűek sejtjei, ezért létfontosságú számukra, hogy olyan gyors válaszmechanizmusokkal rendelkezzenek, amelyek lehetővé teszik számukra a környezet hirtelen változásához való alkalmazkodást.

A stresszorokkal szemben a sejt elsődleges védelmi vonalát a nem enzimatis antioxiidáns vegyületek jelentik, amelyek direkt módon inaktiválják a stresszorokat illetve az azok hatására létrejött szabadgyököket. Következő lépésben a stresszorok hatására létrejött változásokat illetve sérüléseket a sejtek érzékelő rendszereiken keresztül észlelik, és hatásukra összetett jelátviteli rendszerek aktiválódnak. Hasadó élesztőben a stresszválasz legfontosabb jelátviteli útvonala a MAPK kaskád. A jelátviteli rendszer transzkripciós faktorok aktiválása révén szabályozza a válaszreakcióban szerepet játszó gének expresszióját. A transzkripciós faktorok kulcsszerepet játszanak a homeosztatikus folyamatok szabályozásában, aktiválódásuk esetén sokféle gén promóter régióiban található általános stresszválasz elemekhez kötődnek, és ezeken keresztül szabályozzák a génátíródás aktivitását. Az így keletkezett géntermékek segítségével pedig a sejt visszaállítja homeosztatikus állapotát, adaptálódik a körülményekhez és a válaszfolyamatok összessége segítségével visszaállítja növekedését, és osztódási képességét. A környezeti tényezők hirtelen változása a sejtek számára még akkor is stresszt okoz, ha a változás kedvező, így például élesztősejteknel a hőmérséklet 24 °C-ról 37 °C-ra emelése stresszt indukál és a sejtosztódás lassulásához vezet.

Stresszt külső környezeti tényezők és belső, sejten belüli mutációk okozhatnak. Külső körülmények által előidézett stressz esetén beszélünk stresszorokról. Ezek lehetnek a szervezet számára idegen anyagok például: xenobiotikumok, nehézfémek, mikotoxinok, vagy az optimálistól eltérő körülmények is.

A mikotoxinok fonalas gombák által termelt állati sejtekre toxikus anyagok, amelyek egészségügyi kockázata csak az 1970-es években vált ismertté. Jelentős élelmiszerszennyezők, és általában a szennyezett élelmiszerek ízét nem vagy csak kis mértékben változtatják meg, jelenlétük tehát könnyen észrevétlen maradhat. Hatásmechanizmusukról és az általuk előidézett betegségek kezeléséről az ismeretek hiányosak, detoxifikálásukat pedig nagyon megnehezíti, hogy nagy részük

hőstabil, ezért a hagyományos élelmiszer tartósító eljárások nem jelentenek védelmet velük szemben.

Az ellenük való védekezéshez elengedhetetlen a hatásmechanizmusuk pontos megismerése, amely lehetővé teszi megbízható, olcsó és gyors detektálási módszerek, valamint hatékony detoxifikációs eljárások kidolgozását, és megkönnyíti célzott terápiák létrehozását az általuk okozott mérgezésekre.

A homeosztatikus egyensúly fenntartásában résztvevő folyamatok mindegyike többszintű, egymással szorosan összefüggő és átfedő szabályozás alatt áll. A sejtekben aktiválódott folyamatok pozitív és negatív visszacsatolási rendszereken keresztül szabályozódnak, amelyek az aktiválódott folyamatok különböző lépéseit érzékelik. Pozitív visszacsatolás esetén az érzékelt ingerek hatására olyan kaszkád folyamatok indulnak be, amelyek felerősítik a jel erősségét és a folyamatok aktivitását a normál értéken kívülre tolják, míg negatív visszacsatoláskor az inger hatására elinduló reakciósor a folyamat aktivitását blokkolja, és aktivitását egy szűk normál aktivitás értéken belül tartja.

A sejtosztódás során keletkezett mutációk által generált rendellenes géntermékek hatására, illetve a normális géntermékek hiányának hatására, különböző változások jöhetnek létre a sejtek normál metabolikus folyamataiban, illetve a homeosztatikus egyensúly fenntartásáért felelős rendszerekben. Ezeket a változásokat a sejtek szabályozó rendszereiken keresztül kompenzálni igyekeznek, aminek hatására különböző fiziológiás eltérések keletkeznek a normál metabolikus állapothoz képest. A kompenzáció sikerességének mértéke nagyban függ a mutáció illetve mutációk által érintett géntermékek fiziológiás folyamatokra gyakorolt hatásaitól.

Célkitűzések

A PTE, TTK, Általános és Környezeti Mikrobiológiai Tanszékén 1994-ben indult kutatási program keretében az egysejtű mikrogombák (*Schizosaccharomyces pombe*, *Phaffia rhodozyma*, *Candida albicans* stb.) oxidatív stresszfolyamatainak vizsgálatát végezzük különböző oxidatív stresszorokkal.

1. Ennek keretében munkám egyik részében a *P. rhodozyma* karotenoidokat termelő szülői törzs és egy karotenoid deficiens stressztoleráns mutáns redox rendszerét hasonlítottuk össze. Arra kerestük a választ, hogy ebben a rendszerben egy belső fiziológiás stressz - a karotenoidok hiánya - hogyan befolyásolja az élesztősejtek oxidatív egyensúlyát. Előkísérletek alapján alapvető kérdéssé vált, hogy a karotenoidok hiányát okozó mutáció, vagy egy másik, az oxidoredukciós egyensúly megváltozását okozó mutáció eredményezte-e a mutáns magas toleranciáját oxidatív stresszorokkal szemben.

Vizsgálataink során az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

1.1. Hogyan változik a mutáns törzs oxidatív stresszel és nehézfémekkel szembeni tűrőképessége?

1.2. Hogyan változik a mutáns törzsben az intracelluláris reaktív oxigén származékok koncentrációja?

1.3. Történik-e változás az antioxidáns enzimek aktivitásában, és a glutation koncentrációjában a szülői törzshöz képest?

2. Munkám következő fő részében a patulin sejtmembránra gyakorolt hatásának vizsgálatát tűztük ki célul. Elsőként a felhasznált törzs általános jellemzését végeztük el, majd az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

2.1. A membránban bekövetkezett fizikai változások monitorozását elektron spin rezonancia spektroszkópia alkalmazásával végeztük. Arra kerestük a választ, hogy a patulin hatással van-e az élesztősejtek membránfluiditására, valamint hogy ez a változás függ-e, és ha igen, akkor milyen mértékben függ az alkalmazott patulin koncentrációtól?

2.2. A strukturális változások biológiai és fiziológiai hatásának vizsgálatához a sejtől kiáramló 260 nm-nél emittáló anyagok mennyiségének meghatározását végeztük el spektrofotométer segítségével.

3. Ezt követően egy külső oxidatív stressz indukáló ágensnek, a patulinnak a *Schizosaccharomyces pombe* redox rendszerére gyakorolt hatását vizsgáltuk.

Ennek során a következőket terveztük meghatározni:

3.1. Patulin hatására hogyan változik a sejtek glutation koncentrációja és az antioxidáns enzimek specifikus aktivitása? Azaz a patulin kezelés hatásait hogyan szabályozzák a sejtek.

3.2. Patulin hatására milyen változások következnek be a reaktív oxigénszármazékok ($O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , $^{\bullet}OH$) intracelluláris koncentrációjában?

3.3. Hogyan változik a törzs összredukciós kapacitása?

3.4. Megfigyelhető-e adaptációs jelenség a patulinnal szemben?

Alkalmazott módszerek

Kísérleteink első részében az asztaxantin termelő (ATCC 24202, MCP 324) *P. rhodozyma* törzset, valamint az ennek felhasználásával, indukált mutagenézissel előállított MCP 325-ös fehér telepeket képző karotenoid deficiens mutánst használtuk, amely arginin, leucin és lizin auxotrófnak bizonyult. A törzseket 20 °C-on, a szükséges aminosavakkal kiegészített (150 µg/ml) YM táptalajon (0,5% malátakivonat, 0,25% élesztő kivonat, 1% glükóz, 0,25% pepton és 1% agar, pH 5,3) vagy YM tápoldatban (agar nélkül) tenyésztettük.

A munkám második részében az ura4-D18 heterotallikus (h-), uracil auxotróf *Schizosaccharomyces pombe* törzset használtuk. A törzs tenyésztését 30 °C-on, SM tápoldatban (1% glükóz, 0,5% (NH₄)₂SO₄, 0,05% KH₂PO₄, 0,01% MgSO₄ és 0,001% Wickerham vitamin oldat, 100 mg l⁻¹ uracillal kiegészítve pH 5,6) végeztük.

A 24 órás előkultúrából sejtszámolást végeztünk, majd beoltottunk 100 ml tápoldatot úgy, hogy a tenyészet induló sejtszáma 10⁶ sejt ml⁻¹ legyen. A szaporodási görbe felvétele illetve a generációs idő meghatározása az optikai denzitás (OD) λ=595nm növekedés meghatározásával, illetve Bürker kamrás számolással történt.

A mérésekhez 405,5 mM koncentrációjú patulin törzsoldatot készítettünk. Az oldószer acetonitril volt. A további kísérletekben az acetonitril koncentrációját a mintákban egységesen 0,8%-ra állítottuk be.

Növekedés gátló koncentráció, a sejtpusztítás, az adaptáció és a minimális gátló koncentráció vizsgálata

A patulin *S. pombe*-ra gyakorolt növekedés gátló hatását 0 µM, 5 µM, 50 µM, 500 µM és 1000 µM-os patulin koncentrációknál 30 °C-on 10⁶ sejt ml⁻¹ induló sejtszám mellett határoztuk meg. A méréshez spektrofotométert (OD_{595nm}) használtunk. A patulin hatására létrejött sejtpusztítást és adaptációt 10⁸ sejt ml⁻¹ induló sejtszám mellett Na-Hepes (pH 7,4) pufferben vizsgáltuk.

A patulinnal szembeni minimális gátló koncentráció (MIC) meghatározása mikrodilúcióval történt az NCCLS M27-A szabványnak megfelelően. *P. rhodozyma* esetében a nehézfémekkel, oxidatív stresszorokkal és ozmotikus stresszorokkal szembeni MIC meghatározását táptalaj felszínén, foltoltással végeztük.

EPR mérések

A sejteket centrifugáltuk és kétszer mostuk 0,6 M-os KCl oldatban. A protoplasztképzést 1 %-os *Trichoderma harzianum* enzimmal végeztük 0,6 M KCl ozmotikus stabilizáló oldatban. Az enzim kezelés paraméterei: 30 perces 30 °C-on enyhe rázatással történő inkubáció.

A protoplasztálás után a protoplasztokat kétszer mostuk 0,6 M KCl oldatban, majd beállítottuk a 10⁸ sejt ml⁻¹ induló sejtszámot, és a szuszpenziókat 0 µM, 50 µM, 500 µM, és 1000

μM patulinnal kezeltük 20 percig $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on 150 fordulat perc^{-1} -en rázatva. A patulin protoplasztólízis indukciós hatását spektrofotométerrel és sejtszámolással ellenőriztük.

Spin-jelölés: $3\text{ }\mu\text{l}$ 5-doxilsztearinsavat (5-SASL) (5 mg ml^{-1} -es koncentrációjú törzsoldat etanolban oldva) adtunk $500\text{ }\mu\text{l}$ sejtszuszpenzióhoz, majd szobahőmérsékleten 30 másodpercig vortexeltük, 30 másodpercig állni hagytuk, és ezt az eljárást összesen 3-szor ismételtük, elősegítve a spin jelölő beépülését a membránba. A protoplaszt szuszpenziót centrifugáltuk $0,6\text{ M}$ -os KCl oldatban mostuk, majd a sejteket felszuszpendáltuk $100\text{ }\mu\text{l}$ $0,6\text{ M}$ -os KCl oldatban. A szuszpenziót $100\text{ }\mu\text{l}$ térfogatú kapillárisba töltöttük át, újból centrifugáltuk $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on, majd a felülúszót eltávolítottuk.

Az EPR spektrumot ESP 300E spektrométerrel (Bruker, Germany) rögzítettük, amely diTC2007 hőmérséklet szabályzóval volt felszerelve. Az 5-SASL által jelölt zsírsav EPR konvencionális spektrumát $0\text{--}30\text{ }^{\circ}\text{C}$ hőmérséklet tartományban vettük fel. EPR beállítások: mikrohullámú teljesítmény, 5 mW ; tér moduláció 100 kHz ; amplitúdó 2 Gauss .

260 nm-en abszorbeálódó kiáramló anyagok mérése

A kísérlet során 10^7 sejt ml^{-1} sejtszámú szuszpenziót készítettünk fiziológias sóoldatban, amelyhez különböző koncentrációkban ($0\text{ }\mu\text{M}$, $50\text{ }\mu\text{M}$, $500\text{ }\mu\text{M}$, $1000\text{ }\mu\text{M}$) patulint adtunk. A kezelést 120 percig végeztük, a mintavétel 0, 20, 60 és 120 percnél történt. A mintát centrifugáltuk, majd a felülúszó abszorbanciáját mértük 260 nm -en. Ezután a leülepedett sejteket 30 percig desztillált vízben forraltuk, centrifugáltuk majd a felülúszóból újból abszorbanciát mértünk 260 nm -en.

ROS meghatározása

Az intracelluláris peroxid és szuperoxid koncentráció meghatározáshoz rendre dihidroetídiumot és dihidrorodamint 123 (DHR 123) használtunk. A méréseket BD FACSCalibur flow citométer illetve Perkin-Elmer LS50B típusú fluoriméter felhasználásával végeztük el. A festékek végső koncentrációja a mintában minden esetben $10\text{ }\mu\text{M}$ volt. Egy mérés során 20000 sejtet vizsgáltunk. Kiértékeléshez a CellQuest programot használtuk. 0, 30 és 60 perc elteltével mértük a kontroll és a kezelt szuszpenziókat $\lambda_{\text{ex}}=488\text{ nm}$ -en és $\lambda_{\text{em}}=585\text{ nm}$ a dihidroetídium és $\lambda_{\text{em}}=530\text{ nm}$ a DHR 123 esetében.

A hidroxil gyök intracelluláris koncentrációjának és a Cr(VI) redukciós képesség meghatározásához EPR spektroszkópiát használtunk.

Az antioxidáns enzimaktivitások és a glutation koncentráció meghatározása

A GR, GST, GPx, G6PD, CAT, Cu/Zn-SOD és Mn-SOD specifikus aktivitásának és a GSH és GSSG intracelluláris koncentrációjának valamint az összfehérje meghatározásához jól bevált spektrofotometriás módszereket használtunk.

Eredmények és következtetések

Phaffia rhodozyma karotenoid deficiens mutáns vizsgálata

Az MCP 325 fehér mutáns a szülői törzshöz képest szignifikáns rezisztenciát mutatott olyan oxidatív stresszorokkal szemben, mint a lipidperoxid, a menadion, vagy a $K_2Cr_2O_7$. A karotenoid összetételt meghatározása alapján kiderült, hogy a mutáns a szülői törzzsel szemben benzolban oldható karotenoidokat nem tartalmazott. A karotenoidok hiánya azonban nem magyarázza a mutáns megváltozott stressz érzékenységet, mivel az MCP 325-ös mutáns kivételével a többi előállított karotenoid mutánsban nem tapasztaltak változást a menadion, lipidperoxid, $K_2Cr_2O_7$, $ZnSO_4$, KCl és NaCl érzékenységben.

A jelenség magyarázata az lehet, hogy a karotenoidok csak mérsékelt szerepet játszanak a stressztoleranciában *P. rhodozyma*-ban. Következésképpen, az MCP 325-ös mutánsban detektált oxidatív stresszorokkal szembeni rezisztenciákat egy másik mutáció okozhatta.

A szülői és a mutáns törzs generációs ideje gyakorlatilag megegyezett. A szülői törzshöz képest, az MCP 325-ös mutáns szignifikánsan alacsonyabb intracelluláris $O_2^{\bullet -}$ koncentrációt mutatott. Ezzel párhuzamosan specifikus SOD aktivitás is szignifikánsan magasabb volt. Az intracelluláris peroxid ion koncentrációja mintegy 6-szorosa a szülői törzsben található, melyet valószínűleg a 16-szor alacsonyabb kataláz aktivitás idézett elő.

A $\cdot OH$ koncentrációja a szülői törzsben 61 ± 12 %-kal volt magasabb, mint a mutánsban. Ezzel párhuzamosan a Cr(VI) redukáló képesség 4,8-szor magasabb, és a H_2O_2 valamint a GSH koncentrációja szignifikánsan alacsonyabb volt a szülői törzsben. A GR specifikus aktivitása mindkét törzsben azonosnak bizonyult. A NADPH hozzáadása után a mutánsban detektált Cr(V) és $\cdot OH$ koncentráció növekedés a sejt kiegyensúlyozatlan oxidációs állapotára utal.

A mutáns nagyon alacsony alap kataláz aktivitása indukció hatására 11,6-szorosára emelkedett, és megközelítette a szülői törzsben mért kataláz aktivitás értékét. Bár a mutánsban a peroxid ion koncentrációja a szülői törzshöz képest magas, mégsem éri el a kataláz indukciójához szükséges küszöbértéket, amelynek segítségével a sejt visszaállíthatná az oxido-redukációs egyensúlyát.

Az *S. pombe* törzs általános jellemzése

A patulin által előidézett szaporodás gátlás vizsgálatnál $5 \mu M$ patulinnak nem volt detektálható hatása a sejtekre. $50 \mu M$ patulin kissé késleltette a sejtek logaritmusos fázisba lépését, míg 500 és $1000 \mu M$ patulin rendre 32 %-os és 83 %-os csökkenést idézett elő a sejtosztódásban a 35 órás tenyésztési idő végére. Ezek az adatok valószínűsítették egy esetleges adaptációs folyamat létrejöttét patulinnal szemben. A 10 , 30 , 50 és $500 \mu M$ -os patulin kezelés rendre 22,4 %-os, 27,4 %-os, 61,9 %-os és 95,7 %-os csökkenést idézett elő a sejtek telepképző képességében. Az 1 órás szubletális ($10 \mu M$) patulin előkezelést követő 50 és $500 \mu M$ patulinnal történő kezelés hatására a

sejtek túlélőképessége szignifikánsan megemelkedett 38,1 %-ról 83,7 %-ra, és 4,3 %-ról 58,3 %-ra. A patulinnal szembeni MIC 162,2 μ M volt.

Patulin hatása a *S. pombe* membránjára

120 perces patulin kezelés után a kezdeti patulin koncentráció 20%-al csökkent, tehát az élesztősejtek viszonylag gyorsan nagy mennyiségű patulin felvételére képesek.

Méréseinkhez elengedhetetlen volt ellenőrizni, hogy a patulin indukál-e protoplaszt lízist. Bebizonyítottuk, hogy a patulin 1000 μ M-os koncentrációig sem protoplasztlízist, sem protoplaszt-zsugorodást nem okozott a vizsgálat 120 perc-es időtartamán belül.

Kimutattuk, hogy patulin hatására a membránba inkorporálódott szonda molekulák mozgékonyasága nőtt. A kontroll membránok fázis tranzíciós hőmérséklete 14,1°C. 50 μ M, 500 μ M és 1000 μ M patulin kezelés hatására a töréspontok rendre 13,9 °C, 10,1 °C és 8,7 °C-ra csökkentek.

Csökkenő hőmérséklet irányában történő mérések esetében a szignifikáns eltérések hiánya az adott hőmérsékleteken a csatolási állandókban a növekvő hőmérsékleti irányba történő mérésekhez viszonyítva azt jelenti, hogy a patulin jelenlétében a hőmérséklet hatására végbemenő mobilitás változás nem okoz irreverzibilis membrán-módosulásokat.

In vitro kísérletekben bizonyított tény, hogy a patulin célpontjai nukleofill molekulák, különösen a GSH, valamint a tiol és amino csoport tartalmú fehérjék. Hatására intra- és intermolekuláris keresztkötések jönnek létre a célmolekulák között, amelyek nagyon jelentős hatással vannak az alkotó fehérjék biológiai funkciójára és aktivitására. Valószínűleg ehhez hasonló mechanizmussal hoz létre a patulin direkt szerkezeti változást a membrán-fehérjékben és ezen keresztül a plazmamembrán komplex molekula mátrixában ahol minden alkotó kölcsönhatásban áll a többi alkotó elemmel, és ezáltal képes megváltoztatni annak funkcióját.

Az általunk alkalmazott az intracelluláris térből származó, 260 nm-en fényabszorpcióval rendelkező anyagok (nukleotidok, nukleozidok, és szabad bázisok) kiáramlásának detektálása egyszerű és alkalmas módszer összehasonlító vizsgálatokban a membrán barrier funkció károsodásának kimutatására. Méréseink szerint 50 μ M, 500 μ M és 1000 μ M patulin jelenlétében a sejtek rendre 25 %, 30,5 % és 34 %-os anyagvesztéséget szenvednek 20 és 60 perc elteltével (25. ábra). Az anyagvesztés mennyisége egyenes arányban változik a patulin indukálta fázis-tranzíciós változás mértékével.

Az előidézett plazma-membrán barrier funkció elvesztése lehet az egyik fő oka a sejtekben a patulin által előidézett citotoxikus hatásának, továbbá hozzájárulhat a logaritmikus fázisba lépés késleltetéséhez, amely alatt a sejtek bizonyosan megváltoztatják membrán összetételüket illetve a patulin detoxikálásáért felelős folyamataikat, és így adaptálódhatnak a patulin-indukált membránváltozásokhoz.

Patulin oxidatív stressz indukáló hatásának vizsgálata

60 perces 500 μM patulin kezelés szignifikáns növekedést idézett elő a Cu/Zn SOD, CAT, GST enzimek specifikus aktivitásában, valamint nagy mértékben csökkentette az intracelluláris GSH és GSSG koncentrációt.

Ennek hatására a kezdeti erőteljes intracelluláris $\text{O}_2^{\bullet-}$ és H_2O_2 növekedés (30. perc) 50 és 500 μM patulin esetén a 60. percre lassul vagy a H_2O_2 esetében megközelíti a normál mintában mért koncentrációt. Ennek oka, hogy a kataláz egy igen nagy aktivitású enzim, és a patulin hatására 2,5-szeresére növekedett az aktivitása. 1000 μM patulin hatására ilyen jelenséget nem tapasztaltunk: mind a H_2O_2 mind a $\text{O}_2^{\bullet-}$ esetében a ROS koncentráció időarányosan emelkedett, valószínűleg azért, mert a patulin koncentráció túl magas volt, citotoxikus hatásait a sejt már nem volt képes kompenzálni, és nem jött létre transzkripció változás.

A patulin oxidatív stressz indukáló hatás vizsgálatához munkatársaim meghatározták a *S. pombe* MAPK kaskád mutánsok patulinnal szembeni MIC-át. A törzsek közül patulinra a pap1 deléciós mutáns nagyon érzékenynek bizonyult. További mérsékelt érzékenységet figyeltek meg a wis1 és sty1 deléciós mutánsoknál is.

A GSH szint drasztikus csökkenése a Cr redukciós kapacitás erőteljes csökkenését idézi elő, mivel a GSH képes a Cr(V)-öt közvetlenül redukálni. Viszont csak kismértékű hidroxil gyök (OH^{\bullet}) növekedést mértünk a kontrolhoz képest. Ennek oka, hogy 60 perccel a patulin kezelés után az OH^{\bullet} képzéshez szükséges H_2O_2 szint már megközelítette a normál értéket.

NADPH hozzáadása után mind a patulinnal kezelt, mind a kontrol minták Cr(VI) redukáló képessége erőteljesen megemelkedett.

H_2O_2 hozzáadására a Cr(V) szignál nagymértékben lecsökken. A patulinnal kezelt mintákban ez a csökkenés csupán töredéke a kezeletlennek. Ennek oka a CAT specifikus aktivitásának nagymértékű megnövekedése, amely a hozzáadott H_2O_2 -ot elreagáltatja. Ha a mintákhoz H_2O_2 -ot és NADPH-t is adunk a kataláz hatása még szembetűnőbb: A kontrolban a Cr redukciós képesség 0,6 részére csökken, míg a kezelt mintában 2,46-szorosra emelkedik.

Összefoglalás

1. Kísérleteink során először a *P. rhodozyma* egy karotenoid deficiens fehér mutáns stressztoleranciáját és a redox-rendszerében bekövetkezett változásokat vizsgáltuk a szülői törzshöz viszonyítva. Arra voltunk kíváncsiak, hogy egy belső oxidatív stressz - a karotenoidok hiánya, milyen hatással van a törzs redox egyensúlyára.

1.1 Megállapítottuk, hogy a mutáns rezisztensebb, MD-nal, lipidperoxiddal, Zn-kel és Cr-mal szemben, míg H₂O₂-vel szemben szenzitívebb volt. Hasonló rezisztenciákat egyéb karotenoid deficiens mutánsokban nem tapasztaltunk.

1.2. Meghatároztuk a törzsek intracelluláris ROS koncentrációit és a törzs redox-egyensúlyát jól jellemző Cr(VI) redukciós képességet. A mutánsban a O₂^{•-} koncentrációja 0,1 részére csökkent, a H₂O₂ koncentráció 6-szorosára nőtt a szülői törzshöz képest. A [•]OH koncentrációja nagy mértékben lecsökkent. Ezzel párhuzamosan a Cr(VI) redukáló képesség alacsonyabbnak bizonyult. NADPH hozzáadása után a mutánsban detektált [•]OH és Cr(V) koncentráció növekedés a sejtek kiegyensúlyozatlan oxidációs állapotára utalt.

1.3. Kimutattuk, hogy a mutánsban a GSH koncentrációja szignifikánsan csökkent, a GSSG -é pedig megemelkedett. Az antioxidáns enzimek közül a SOD aktivitása nőtt, míg a CAT aktivitása jelentősen csökkent, a GR aktivitása pedig nem változott.

Kísérleteink alapján új eredménynek tekintjük, hogy a karotenoidok termelődésének teljes blokkja *Phaffia rhodozyma*-ban csupán kis szerepet játszik az oxidatív stressz elleni védekezésben. Az adott törzs genomjában bekövetkezett másik mutáció feltehetően a CAT enzim regulációjában okozott nagymértékű változásokat, amely a sejt számára még tolerálható oxidatív stresszt hozott létre.

2. Munkám második felében a patulin sokirányú hatását vizsgáltuk *S. pombe*-n. Kimutattuk, hogy a sejtek rövid idő alatt nagy mennyiségben képesek felvenni a patulint.

2.1. Bebizonyítottuk, hogy a patulin a plazmamembránnal találkozva reakcióba lép vele, és ezáltal strukturális változásokat hoz létre benne, valószínűleg az ott található szabad tiol- és aminos csoport tartalmú membránfehérjékre hatva. Kimutattuk, hogy a sejtmembrán fázistranziációs hőmérséklete és fluiditása a patulin kezelés koncentrációjával arányosan csökken.

2.2. Bebizonyítottuk, hogy a patulin koncentrációval arányos mértékben emelkedik a sejtől kiáramló 260 nm-en emittáló anyagok koncentrációja, a plazmamembrán barrier funkciója károsodik és a sejtől létfontosságú anyagok kiáramlása történik.

3. Ezt követően a patulin *S. pombe* redox rendszerére gyakorolt hatását vizsgáltuk meg.

3.1. Méréseink megerősítették, hogy a patulin a sejtbe jutva reakcióba lép az ott található peptidekkel, köztük az intracellulárisan nagyon magas koncentrációban jelenlévő glutationnal. A

GSH-patulin reakció segítségével a sejt képes mérsékelni a patulin citotoxikus hatását. Ennek a reakciónak a jelentőségét mutatja, hogy a sejt a későbbiekben ezt a folyamatot a GST enzimaktivitásának növelésével még gyorsítja.

3.2. Kimutattuk, hogy a GSH nagymértékű intracelluláris koncentrációjának csökkenése a szuperoxid és peroxid ion koncentrációjának intracelluláris emelkedését eredményezi, és a sejtben oxidatív stressz indukálódik. A ROS emelkedése hatására DNS károsító folyamatok is beindulnak, amely a mások által leírt genotoxikus hatást eredményezik.

Ezek a folyamatok a MAPK kaszkád aktiválódásához vezetnek, amelynek hatására az antioxidáns enzimek specifikus aktivitása megemelkedik. Külön kiemelhető a kataláz enzim aktivitásának erőteljes megemelkedése, amely többé-kevésbé sikeresen megakadályozza mind a hidrogénperoxid, mind pedig az ebből származó $\cdot\text{OH}$ koncentráció megnövekedését.

3.3. A patulin kezelés hatására bekövetkező GSH szint drasztikus csökkenésének hatására a sejt összredukciós kapacitása erőteljesen lecsökken.

3.4. Az élesztő sejt tehát rövidtávon képes még akár 500 μM -os patulin koncentráció hatásait is kompenzálni a vizsgált sejtkoncentráció mellett az oxido-redukciós rendszerének megváltoztatásával, de az alkalmazkodásnak komoly ára van. A glutation készlet drasztikus csökkenése, és a fehérjékben bekövetkező változások hatására a 60 perces 500 μM -os patulin koncentrációval kezelt sejteknek ugyanis mindössze 4,36 %-a képes telepet képezni, a többi pedig elpusztul. A sejtek azonban mégis sikeresen kivédhetik a patulin okozta letális károsodásukat. Bebizonyítottuk, hogy amennyiben alacsony koncentrációjú előkezelésen esnek át a sejtek szaporodása lelassul, lehetőséget teremtve az adaptációs folyamatok végbemenetelére. A sejtek a redox rendszerük és esetleg a membránösszetételük módosításával a túlélés esélyét nagymértékben növelni tudták.

Legjobb tudomásunk szerint először mutattunk ki adaptációs mechanizmust patulinnal szemben.

A patulin membránra gyakorolt fluidizáló hatására valamint az ehhez kapcsolódó plazmamembrán barrier funkció változásra munkánk szolgáltatja az első direkt biofizikai bizonyítékot.

Noha már ismert, hogy a patulin növeli a ROS mennyiségét, és csökkenti az intracelluláris GSH koncentrációt, de ez az első, egy rendszerben végzett összefoglaló vizsgálat, amely a patulin eukarióta modellszervezet redox-rendszerére gyakorolt hatását vizsgálja.

Az értekezés alapjául szolgáló nemzetközi folyóiratban megjelent tudományos közlemények:

- Horváth, E.,** Papp, G., Belágyi, J., Gazdag, Z., Vágvölgyi, Cs., Pesti, M. In vivo direct patulin-induced fluidization of the plasma membrane of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. Food and Chemical Toxicology. 48: 1898-1904. (2010) IF.: 2,321
- Horváth, E.,** Papp, G., Gazdag, Z., Belágyi, J., Blaskó, Á., Deli, J., Vágvölgyi, Cs., Pesti, M. Regulation of mutation-induced stress processes of *Phaffia rhodozyma*. Acta Biologica Hungarica. 62: No. 2657. (2011) (megjelenés alatt) IF.: 0,619
- Papp G., **Horváth E.,** Gyöngyi Z., Gazdag Z., Mike N., Vágvölgyi Cs., Hornok, L., Pesti, M. Patulin-induced stress processes in fission yeast. Food and Chemical Toxicology. (2011) (megjelenés előtt) IF.: 2,321

Az értekezésben nem szereplő nemzetközi folyóiratban megjelent tudományos közlemények:

- Horváth, E.,** Kálmán, N., Pesti, M., Iwata, K., Kunsági-Máté, S. Thermodynamic and kinetic processes during folding of BSA protein. Biophysical Chemistry (2011) (megjelenés előtt) IF.: 2,276
- Horváth, E.,** Papp, G., Mike, N., Nagy, G., Turani, M., Balogh, E., Pollák E., Pesti, M., Banfalvi, G. Patulin induced biochemical and morphological changes in *Schizosaccharomyces pombe* cells. Toxicology In Vitro (2011) (megjelenés előtt) IF.: 2,060

Az értekezés alapjául szolgáló posztterek, előadások:

- Horváth, E.,** Papp, G., Belágyi, J., Gazdag, Z., Mike, N., Kőszegi, B., Vágvölgyi, Cs., Pesti, M. Patulin-induced plasma membrane fluidization and oxidative stress induction in *Schizosaccharomyces pombe*. Power of microbes in industry and environment, Malinska, Croatia (2010)
- Horváth, E.,** Papp, G., Gazdag, Z., Belágyi, J., Mike, N., Vágvölgyi, Cs., Pesti, M. Patulin induced plasma membrane fluidization and oxidative stress induction on *Schizosaccharomyces pombe*. 2nd CESC 2010 Central European Summer Course on Mycology, Szeged, Hungary, pp.43. (2010)
- Horváth, E.,** Papp, G., Belágyi, J., Gazdag, Z., Kőszegi, B., Mike, N., Vágvölgyi, Cs., Pesti, M. In vivo direct patulin-induced fluidization of the plasma membrane of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. VI. Latin American Congress on Mycotoxins, Merida, Mexico (2010)
- Horváth E.,** Papp G., Belágyi J., Maraston E., Pesti M. Is the plasma membrane the first attack point of patulin? Worldwide Mycotoxin Reduction in Food and Feed Chains. Tulln/Vienna, Austria. pp. 100. (2009)

Horváth, E. XXVIII. OTDK Biológia Szekció, Debrecen, Magyarország, Egy *Phaffia rhodozyma* karotenoid mutáns törzs jellemzése. témavezetők: Dr Pesti Miklós, Papp Gábor, Általános és Környezeti Mikrobiológiai tanszék. pp. 182. (2007)

Az értekezés alapjául szolgáló referált folyóiratban megjelent poszterabsztraktok:

Horváth, E., Papp, G., Belágyi, J., Gazdag, Z., Vágvölgyi, Cs., Pesti, M. Patulin-induced plasma membrane fluidization and oxidative stress induction on *Schizosaccharomyces pombe*. 3rd Central European Forum for Microbiology, Keszthely, Hungary Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica 30: 145-146. (2010)

Horváth, E., Papp, G., Gazdag, Z., Kálmán, N., Belágyi, J., Mike, N., Vágvölgyi, Cs., Pesti M. The influence of patulin on *Schizosaccharomyces pombe* plasma membrane. 2nd Central European Forum for Microbiology, Keszthely, Hungary Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica 56: 169-170. (2009)

Horváth E., Papp G., Blaskó Á., Belágyi J., Vágvölgyi Cs., Pesti M. Characterization of a carotenoid deficient mutant strain of *Phaffia rhodozyma*. International Congress of Hungarian Microbiological Society, Keszthely, Hungary. Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica 53: 276-277. (2006)

Az értekezésben nem szereplő poszterek, előadások

Treitz, M., **Horváth, E.,** Csikász, T. Fekete szár és levélfoltosság (*Phoma macdonaldii*) rezisztencia viszonyainak vizsgálata napraforgóban. XIII. Növénynevelési Tudományos Napok Budapest 2006. 99.o.

A megjelent cikkek összesített impakt faktora: 2,99

A megjelenés előtt álló cikkek összesített impakt faktora 6,607

